Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 844-857




نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 857-844

بکارگیری *لاکتوباسیلوس‌روتری* در تهیه نان پروبیوتیک بخش 1: ارزیابی فرآیند ریزپوشانی به روش بسترشناور بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس‌روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده

لیلا زاغری[1]- علیرضا بصیری[*2]- سمیه رحیمی[2]- علی زنوزی[3]

تاریخ دریافت: 1395/03/29
تاریخ پذیرش: 1395/09/28

چکیده

کاهش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول فرآوری، نگهداری و هم‌چنین تحت تاثیر شرایط اسیدی معده، مهم‌ترین محدودیت در تولید فرآورده‌های پروبیوتیک به‌شمار می‌آیند. فناوری ریزپوشانی با محافظت از باکتری‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی، می‌تواند باعث افزایش زنده‌مانی گردد. در این تحقیق از فن‌آوری بستر شناور، به‌منظور تولید میکروکپسول‌های پوسته و هسته، حاوی *لاکتوباسیلوس‌روتری* استفاده شد. منحنی رشد بدست‌آمده نشان داد که باکتری‌ها 16 تا 18 ساعت پس از تلقیح وارد فاز ثابت رشد شده و آماده جداسازی توده سلولی از محیط کشت، می‌باشند. بررسی اثرات دمای هوای ورودی و نسبت باکتری به قندها در فرمولاسیون، نشان داد که زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و در نسبت برابر قند و باکتری (10-10) به‌طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) افزایش نشان می‌دهد. زنده‌مانی نسبی باکتری‌های جذب شده در ماتریس هسته، قبل و پس از پوشش‌دهی در دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور با محلول‌های شلاک در سه غلظت 16، 17 و 18 درصد (وزنی/ حجمی) و آلژینات سدیم در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد (وزنی/ حجمی)، کاهش معنی‌داری ($P\leq0/05$)، نشان نداد. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم با غلظت 1 درصد (وزنی/ حجمی) پس از طی دوره زمانی 1 ساعت در شرایط شبیه‌سازی شده معده با pH=2، به‌طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) نسبت به پوشش‌های دیگر افزایش نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس‌روتری*، ریزپوشانی، پوشش‌دهنده بسترشناور، شرایط شبیه‌سازی شده معده

مقدمه

با افزایش سطح آگاهی جامعه نسبت به نقش تغذیه در ارتقا سلامت، تقاضا برای مصرف غذاهای فراسودمند افزایش یافته است. گردش مالی بازار جهانی فرآورده‌های پروبیوتیک در سال 2014، 32/6 میلیارد دلار بود که رشد سالیانه‌ای بالغ بر 7 درصد نشان می‌دهد (Reid, 2015). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در غلظت مناسب با تعدیل فلور میکروبی روده، اثرات سلامت‌بخشی را بر روی میزبان اعمال می‌کنند. در بین پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید شامل گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر*، بیش از همه مورد توجه قرار دارند. باکتری‌های پروبیوتیک برای ایجاد اثرات سلامت‌بخش خود، باید به‌صورت زنده و فعال به تعداد کافی (CFU/gr) 10^7-10^6 به روده انتقال یابند که معمولا تعداد زیادی از این باکتری‌ها در هنگام عبور از معده و در مواجهه با شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک‌های صفراوی از بین می‌روند. از فناوری ریزپوشانی می‌توان به‌منظور کنترل رهایش، افزایش زنده‌مانی و هم‌چنین حفظ ساختار باکتری‌ها در حین عبور از معده و قبل از انحلال در روده استفاده نمود. در روش رایج ریزپوشانی، باکتری‌های پروبیوتیک در یک ژل‌ماتریس از ترکیبات طبیعی همانند آلژینات، ژلان و کاراگینان محصور می‌گردد. محدودیت اصلی این روش، پایداری پایین باکتری‌ها و هم‌چنین عدم سهولت بکارگیری میکروکپسول‌ها در فرمولاسیون‌های غذایی به‌ویژه در ظرفیت‌های بالای تولید می‌باشد. ماتریس‌های شیشه‌ای که با استفاده از فناوری‌هایی مانند خشک‌کردن پاششی، انجمادی و یا بستر شناور بدست می‌آیند، می‌توانند جایگزین مناسبی برای ژل‌ماتریس‌ها باشند (Semyonov *et al*., 2010; Stephan *et al*., 2007). شل و بیرمن (2014) از شلاک و پروتئین آب‌پنیر شیرین برای ریزپوشانی

1و 2- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
3- استادیار گروه مهندسی زراعی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
(* - نویسنده مسئول: Email: bassiri@irost.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.56856

لاکتوباسیلوس‌روتری با استفاده از پوشش‌دهنده بستر شناور استفاده و نشان دادند که ریزپوشانی با ترکیبات مورداستفاده منجر بـه افـزایش زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده می‌گـردد. استامر و همکاران (2010)، باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* را یک‌بار با محلول شلاک و گلیسرول و بار دیگر با محلـول شـلاک و آلژینـات سدیم با نسبت‌های 95 و 5 درصد و با استفاده از دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور، ریزپوشانی و زنده‌مانی نسبی باکتری پـس از طـی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، بررسی‌کردند. زنده‌مانی نسبی باکتری پس از طی دوره زمانی در محیط شبیه‌سازی شده اسید معده، با محلول شلاک- گلیسرول و شلاک- آلژینات سدیم، به‌ترتیـب 41 درصـد و 0/14 درصـد بـود. مانـدل و همکـاران (2006)، بـاکتری *لاکتوباسیلوس‌کازئی* را در غلظت‌های مختلفـی از آلژینـات (2، 3 و4 درصد) به روش امولسیون، ریزپوشانی و زنده‌مانی باکتری را پـس از طی دوره زمانی (1-3 سـاعت) در شـرایط شـبیه‌سـازی شـده معـده بررسی‌کردند. نتایج بررسی نشان داد که افزایش غلظت آلژینات منجر به افزایش زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی شـده مـی‌گـردد. لـی و هیـو (2000)، بـاکتری *بیفیـدوباکتریوم‌لانگـوم* را بـا آلژینـات سـدیم در غلظت‌های 2، 3 و 4 درصد با روش امولسیون، ریزپوشانی‌کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت آلژینات سدیم و اندازه قطر میکروکپسول‌ها، زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی در شـرایط شبیه‌سازی شده معده، افزایش می‌یابـد. گـراف و همکـاران (2007)، مخمر *ساکارومایسس‌بولاردی* را با آلژینات سدیم با غلظت 2 درصـد (وزنی/ حجمی) به روش امولسیون ریزپوشانی کردند. میزان زنده‌مانی باکتری پـس از طـی دوره زمـانی 1 سـاعت در شـرایط اسـیدی بـا pH =1/2 برابر با 13/3 درصـد بـود. سـابیخی و همکـاران (2010)، باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را با آلژینات سدیم بـا غلظـت 4 درصد (وزنی/ حجمی) و نشاسته ذرت بـا غلظـت 2 درصـد (وزنـی/ حجمی) به روش امولسیون ریزپوشانی کردند. میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده 1/71 سیکل لگاریتمی و در نمونه شاهد 4/94 سیکل لگـاریتمی، کـاهش یافـت. سـلتانا و همکـاران (2000)، بـاکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را با آلژینات سـدیم بـا غلظـت 2 درصـد (وزنی/ حجمی) و 2 درصد نشاسته ذرت (ترکیـب پـری‌بیوتیـک) بـه روش امولسیون ریزپوشانی‌کردند. میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی 3 ساعت در شرایط اسیدی با pH =2، 5 سیکل لگاریتمی کاهش یافت.

هـدف از انجـام ایـن تحقیـق، ارزیـابی فـن‌آوری ریزپوشـانی هسته- پوسته با استفاده از دو پوشش آلژینات سـدیم و شـلاک، بـر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* در شرایط شـبیه‌سـازی شـده معده (pH =2) به روش بسترشناور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مـواد مـورد اسـتفاده در ایـن تحقیـق شـامل مالتودکسـترین $C_{6n}H_{(10n+2)}O_{(5n+1)}$ (DE=3)، سوربیتول $C_6H_{14}O_6$، آلژینات سدیم $C_6H_9NaO_7$ و پپسین از شـرکت سـیگما- آلـدریچ (آلمـان)، کلریـد سدیم، اسید کلریدریک و پودر شیر پس‌چرخ از شرکت مرک (آلمان)، شـلاک $C_{30}H_{50}O_{11}$ از شـرکت آکواگلـد (آلمـان)، میکروکریسـتالین سلولز $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Avicel ph-20) از شـرکت اف‌ام‌سـی بیـوپلیمر (بلژیک)، محیط کشت MRS آگار و براث از شـرکت تیتـان بیوتـک (هندوستان)، سرم رینگر و محلول کلرید سدیم از شـرکت داروسـازی ثـامن (ایـران) و بـاکتری *لاکتوباسـیلوس‌روتـری* (PTCC -1655) به‌صورت کشت زنده، از مرکز منطقه‌ای میکروارگانیسم‌های صـنعتی (ایران) تهیه شدند.

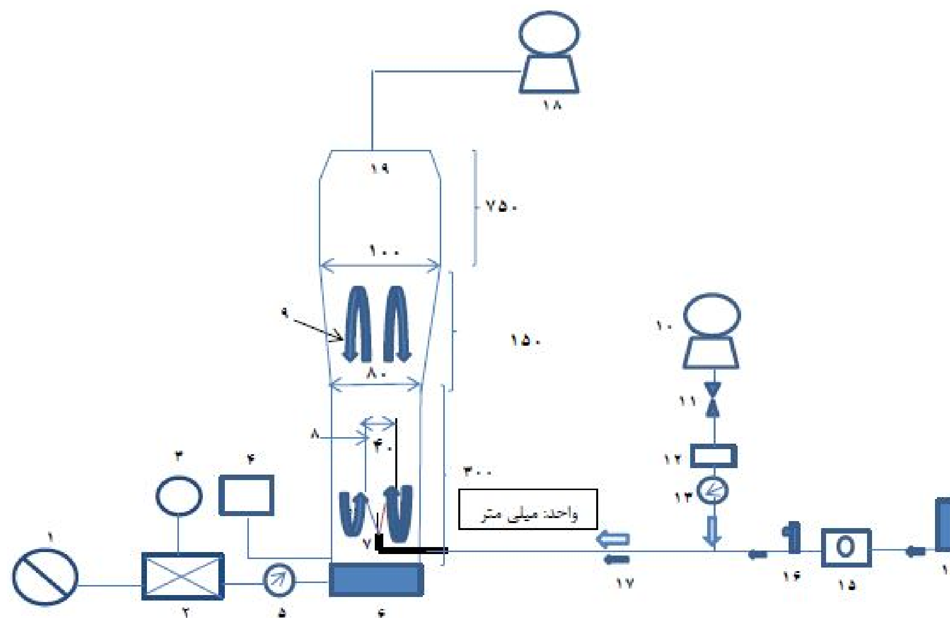
تعیین منحنی رشد

به‌منظور رسم منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری*، جـذب نوری در طول موج 600 نانومتر در طول مدت کشت در مقایسـه بـا محیط کشت اولیه بر اساس جدول مک‌فارلنـد در اسـپکتروفتومتر 25 (Prekin UV/VIS، ایالات متحده آمریکا) خوانده شد. کشـت زنـده *لاکتوباسیلوس‌روتری* به میزان 1 گرم به 100 میلی‌لیتر محیط کشت MRS براث افزوده و به مـدت 18-24 سـاعت در دمـای 37 درجـه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. تکثیر سلولی با واکشـت سـلول‌هـای فعال‌شده به میزان 10 درصد (100 میلی‌لیتـر پـری‌کـالچر در 1000 میلی‌لیتر محیط کشت تازه MRS براث) انجام شد و به مدت 36-48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد (Sinha *et al*., 2001). از محلول شیر پس‌چرخ برای کاهش آسیب برودتـی بـه سلول‌ها در مرحله انجماد، استفاده شد. پودر شیر پس‌چرخ بـه میـزان 10 درصد (وزنی/ حجمی) به آب مقطر افزوده و به مدت 5 دقیقه در اتوکلاو و در دمای 121 درجه سانتی‌گراد، اسـتریل شـد (Meng *et al*., 2007). محیط کشت حاوی توده سلولی با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار (Beckman J2-21، آلمان) در سرعت 5000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ و توده سلولی تـه‌نشـین شـده از محـیط کشت جدا و شیر پس‌چرخ در شرایط استریل، به آن افزوده شد. محیط حاوی سلول‌ها به مدت 12 ساعت در فریـزر و در دمـای 18- درجـه سانتی‌گراد منجمـد و در خشـک‌کـن انجمـادی (Haube,300MW، آلمان)، در دمای 20- درجه سانتی‌گراد و به مدت 48 ساعت خشـک شد (Marinescu *et al*.,2012).

طراحی و ساخت دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور

دسـتگاه پوشـش‌دهنـده بسـتر شـناور بـا الهـام از مـدل ورسـتر (Würster,1959) ساخته شد (شکل1). ستون عمودی پوشش‌دهنده

شامل سه بخش می‌باشد، بخش اول لوله‌ای شیشه‌ای از جنس پلی‌کربنات به قطر 80 میلی‌متر و ارتفاع 300 میلی‌متر و ارتفاع بخش دوم، 150 میلی‌متر می‌باشد. بخش متصل به لوله اول دارای قطر 80 میلی‌متر بوده و سطح داخلی لوله دارای شیب ملایم 15 درجه بوده و عرض لوله در انتهای این بخش، 100 میلی‌متر می‌رسد. طول بخش سوم 750 میلی‌متر است که در انتهای این بخش فیلتر (19) در مسیر هوای خروجی از دستگاه قرار می‌گیرد. در بخش اول (لوله شیشه‌ای) ذرات با سرعت به سمت بالای ستون حرکت می‌کنند و هنگامی که به قسمت دوم دستگاه می‌رسند، سرعت جریان هوا کاهش یافته و ذرات قادر به ادامه حرکت بالارونده خود نبوده و از نواحی کناری داخل ستون به پایین سقوط می‌کنند و به این ترتیب ذرات در ستون دستگاه، شناور باقی می‌مانند (9). لوله میانی (8) به ارتفاع 150 و قطر 40 میلی‌متر در بالای نازل پاشش (7) در وسط استوانه، قرار گرفته شده است. در کف ستون دستگاه، صفحه‌ای مشبک (6) قرار گرفته است که پودر MCC (میکروکریستالین سلولز) روی آن قرار می‌گیرد. قطر روزنه‌های صفحه در مرکز بزرگ‌تر و در اطراف کوچک‌تر می‌باشد، که باعث جهت‌دهی جریان هوای خروجی از فن (1) (BG.903.NMB، چین) و ذرات به سمت مرکز دستگاه (لوله میانی) می‌شود. در اطراف ستون و با فاصله گرفتن از مرکز، سرعت جریان هوا کاهش یافته و امکان برگشت برای پودرهای شناور در بالای دستگاه که بر اثر کاهش فشار به سمت پایین حرکت می‌کنند را فراهم می‌کند. دبی محلول پوششی ورودی (14) با تعبیه یک شیر کنترل جریان (16) (شیر استیل فشار قوی، 6000 psi) در مسیر خروجی پمپ پریستالتیک (15) (Heidolph، آلمان) تنظیم و به کمک جریان هوای کمپرسور باد (10) (صبا، ایران)، فشار لازم برای اتمایزه‌کردن محلول پوششی (17) فراهم گردید.



شکل 1- نمای شماتیک دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور

1- فن 2- هیتر 3- دیمر 4- ترمومتر دیجیتال 5- فشارسنج 6- صفحه پخش هوای ورودی 7- نازل 8- لوله میانی دستگاه 9-مسیر حرکت ذرات 10-کمپرسور 11- شیر کنترل 12- خشک کن هوای خروجی 13- فشارسنج 14- محلول پوششی 15- پمپ پریستالتیک 16- شیر کنترل جریان 17-جریان هوای اتمایزه و محلول پوششی 18- دمنده 19- فیلتر هوای خروجی

آماده‌سازی محلول قندی محافظت‌کننده حرارتی هسته

سرم رینگر تا دمای 93 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و پس از افزودن قندهای سوربیتول و مالتودکسترین با DE= 3 و با نسبت برابر در غلظت‌های تحت بررسی، در دمای محیط خنک شده و باکتری‌های خشک‌شده در شرایط استریل به آن افزوده شدند. محلول در ظرف شیشه‌ای درب بسته استریل و در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Semyonove *et al*.,2014).

۱۱

جذب باکتری بر روی پودر MCC

5 گرم از پودر MCC در بستر پوشش‌دهنده درجریان هوا با فشار 150 میلی‌بار شناور و 5 میلی‌لیتر از محلول حاوی باکتری و قند با غلظت 20 درصد (وزنی/ حجمی)، پاشیده شد. پس از مرحله جذب، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در پودر سنجیده شد (Semyonove *et al*.,2014).

شمارش سلول‌های زنده در محلول پروبیوتیک

شمارش سلول‌های زنده در سوسپانسیون اولیه (CFU/ml) با روش کشت سطحی سنجیده شد. 0/5 میلی‌لیتر از محلول پروبیوتیک قند و باکتری برداشته‌و 10 بار نمونه در سرم فیزیولوژی 0/9 درصد کلریدسدیم به حجم 4/5 میلی‌لیتر رقیق شد. مقدار100 میکرولیتر از سریال رقت‌های 7 تا 10 برداشته‌و روی سطح پلیت حاوی محیط کشت MRS آگار در سه تکرار کشت و به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. نمونه‌هایی حاوی 20 تا 350 کلونی (CFU/ml) شمارش شد (Semyonove *et al*.,2014).

شمارش سلول‌های زنده در پودر MCC پس از جذب محلول باکتری

0/5گرم از پودر MCC (پس از مرحله جذب)، در دمای محیط و در شرایط استریل در فالکون حاوی 4/5 میلی‌لیتر محلول استریل کلریدسدیم 0/9 درصد، آب‌گیری و در شیکر با سرعت 450 دور در دقیقه به مدت 60 دقیقه مخلوط شد. شمارش سلول‌های زنده (CFU/ml) به روش کشت سطحی، سنجیده شد. زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها (%) از نسبت تعداد سلول‌های زنده در محلول پروبیوتیک اولیه به تعداد سلول‌های زنده در پودر MCC پس از جذب بدست آمد (Semyonove *et al*.,2014).

بررسی اثرات غلظت باکتری در محلول ورودی بر قدرت زنده‌مانی باکتری

محلول ورودی با غلظت20 درصد (وزنی/ حجمی)، شامل پودر خشک شده انجمادی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و نسبت برابر قندهای سوربیتول و مالتودکسترین با DE=3 تهیه شد. نسبت‌های تحت بررسی باکتری و قند در جدول 2 آورده شده است. هر محلول به‌صورت مجزا در سه تکرار با سرعت 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه بر روی 5 گرم پودر MCC، شناور در بستر دستگاه با فشار هوای ورودی 150 میلی‌بار و دمای 37 درجه سانتی‌گراد پاشیده شد. آزمون شمارش باکتری‌های زنده در محلول پروبیوتیک اولیه، قبل و پس از جذب روی پودر MCC، انجام شد.

بررسی اثرات دمای هوای شناورسازی بر زنده‌مانی نسبی باکتری

محلول با غلظت 20 درصد باکتری و قند (با نسبت برابر) آماده و در سه دمای 37 ،47 و62 درجه سانتی‌گراد، هر بار 5 میلی‌لیتر از محلول با سرعت جریان 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه بر روی 5 گرم پودر MCC شناور در بستر دستگاه با فشار هوای شناورسازی 150 میلی‌بار، در سه تکرار پاشیده شد. آزمون شمارش باکتری‌های زنده در محلول پروبیوتیک اولیه، قبل و پس از مرحله جذب، انجام شد. دمای جریان هوای ورودی با بیشترین میزان زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در پودر، به‌عنوان دمای بهینه، انتخاب شد. بعد از انجام آزمون‌های بهینه‌سازی (غلظت باکتری و قند در محلول پروبیوتیک اولیه، سرعت جریان محلول ورودی، میزان فشار هوای خروجی پمپ و دمای هوای شناورسازی در مرحله جذب محلول باکتری و قند بر روی پودر MCC)، محلول باکتری در شرایط بهینه، جذب پودر MCC شد و مراحل پوشش‌دهی بر روی این پودر انجام شد.

اثرات ریزپوشانی بر زنده‌مانی نسبی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده

باکتری‌های جذب‌شده بر روی MCC با محلول شلاک در سه غلظت 16، 17 و 18 درصد (وزنی/ حجمی) و آلژینات سدیم در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد (وزنی/ حجمی) در شرایط بهینه بدست آمده در مرحله جذب، پوشش‌دهی شدند. غلظت باکتری‌های زنده (٪) در پودر پوشش‌دهی شده و پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، تعیین و غلظت بهینه در ریزپوشانی با شلاک و آلژینات سدیم بر اساس بیشترین زنده‌مانی نسبی (٪) تعیین‌و با هم مقایسه و در نهایت پوشش بهینه برای ریزپوشانی باکتری بدست آمد.

شبیه‌سازی شرایط اسیدی معده

3/2 گرم پپسین با محلول کلرید سدیم 0/5درصد مخلوط و به وسیله اسید کلریدریک 0/1مولار pH آن به 0/5± 1/5 رسانیده شد. محلول اسیدی به حجم یک لیتر رسانیده و به مدت 15 دقیقه در دمای 121 درجه سانتی‌گراد استریل شد (Sanjay *et al*., 2007).

سنجش میزان مقاومت باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده

برای ارزیابی مقاومت باکتری‌های ریزپوشانی‌شده به شرایط اسیدی، 0/5گرم از میکروکپسول‌ها در فالکون استریل حاوی 4/5 میلی‌لیتر محلول اسیدی، غوطه‌ور و در دمای37 درجه‌سانتی‌گراد به مدت 2ساعت، گرمخانه‌گذاری شد. به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، سانتریفوژ با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه، انجام شد. 0/5میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و پس از تهیه سریال رقت، کشت سطحی بر روی محیط MRS آگار انجام شد. سپس رسوب حاصل از پودر، (ته‌نشین‌شده در پایین فالکون) توسط میله شیشه‌ای در شرایط استریل، هم‌زده و دوباره در محلول غوطه‌ور گشت، پس از آن در شیکر با سرعت 450 دور در دقیقه، به مدت 1 ساعت برای آزاد سازی بیشتر باکتری قرار داده شد. شمارش باکتری‌ها به روش ذکر شده صورت گرفت. شمارش کل باکتری‌های زنده لاکتوباسیلوس‌روتری شامل، باکتری‌های شناور بر روی سطح محلول و باکتری‌های زنده که از کپسول‌ها آزاد شده‌اند، می‌باشد

(Semyonove *et al*.,2014).

مشاهده مورفولوژی باکتری‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

کپسول‌ها به‌وسیله چسب دو طرفه بر روی صفحه مخصوص دستگاه تثبیت و به مدت 2 دقیقه به‌وسیله طلا پوشش‌دهی شد. مشاهده کپسول‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی (Mira,Tescan، انگلستان)، با تابش الکترونی 7 کیلوولت انجام پذیرفت.

پوشش شلاک

15 میلی‌لیتر محلول آبی شلاک با غلظت‌های 16، 17 و 18 درصد (وزنی/ حجمی)، شامل 95 درصد محلول شلاک و 5 درصد گلیسرول (پلاستی‌سایزر) آماده و با فشار هوای خروجی پمپ 300 میلی‌بار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با سرعت 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه بر روی گرانول‌های مرحله قبل (پودر MCC حامل باکتری) که با فشار 150 میلی‌بار شناور شده‌اند، پاشیده شد. آزمایشات در هر یک از غلظت‌های تحت بررسی به‌صورت جداگانه و در سه تکرار انجام شدند. پس از هر مرحله، غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) در پودر پوشش‌دهی شده و غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده، محاسبه شد و غلظت بهینه برای پوشش شلاک بر اساس بیشترین زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی درشرایط شبیه‌سازی شده معده، تعیین و با هم مقایسه شدند و در نهایت بهترین غلظت برای پوشش شلاک تعیین شد (Stummer *et al*.,2010).

پوشش آلژینات سدیم

15 میلی‌لیتر محلول آبی از آلژینات سدیم با غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد (وزنی/ حجمی) آماده شد. این محلول با فشار هوای خروجی پمپ 300 میلی‌بار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با سرعت 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه بر روی گرانول‌های مرحله قبل (پودر MCC حامل باکتری) که با فشار هوای150 میلی‌بار شناور شده‌اند، پاشیده شد. آزمایشات در هر یک از غلظت‌های تحت بررسی به‌صورت جداگانه و در سه تکرار انجام شدند. بعد از هر مرحله، غلظت باکتری‌های زنده در پودر پوشش‌دهی شده (CFU/ml) و غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، محاسبه شد و غلظت بهینه برای پوشش آلژینات سدیم بر اساس بیشترین زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، تعیین و با هم مقایسه شدند و در نهایت بهترین غلظت برای پوشش آلژینات سدیم بدست آمد (Michael *et al*., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق، به روش تجزیه واریانس یکطرفه (One way ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش21) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن، انجام شدند.

نتایج و بحث

منحنی رشد باکتری لاکتوباسیلوس‌روتری

باکتری‌ها در زمان ورود به فاز ثابت (پایان مرحله رشد لگاریتمی)، دارای بالاترین مقاومت در برابر تنش‌های محیطی بوده که مناسب‌ترین زمان برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت می‌باشد (Meng *et al*., 2007). منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری بدست آمده* (شکل 2)، نشان داد که باکتری در 4 ساعت اولیه در فاز تاخیری بوده (بخش اول)، از ساعت پنجم شروع به رشد لگاریتمی کرده (بخش دوم) و از ساعت 16- 18 وارد فاز ثابت رشد (بخش سوم) می‌شود که بر این اساس، زمان 16 تا 18 ساعت پس از تلقیح برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت و خشک‌کردن انجمادی بدست آمد. بایان (2008)، منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* (DPC16) را در محیط کشت MRS آگار در دمای گرمخانه‌گذاری 37 درجه سانتی‌گراد، تعیین نمود. نتایج وی نشان‌داد که باکتری به مدت 8-10 ساعت اولیه در فاز تاخیری بوده و سپس وارد فاز رشد شده و پس از 14-16 ساعت، وارد فاز ثابت رشد می‌شود. ولفگنگ و همکاران (2000)، منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* (SD2112) را در محیط کشت MRS آگار در دمای گرمخانه‌گذاری 35 درجه سانتی‌گراد، تعیین و نشان دادند که باکتری، پس از 16-18 ساعت وارد فاز ثابت رشد می‌شود. واگنر و همکاران (2012)، منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* (RC-14) را در محیط کشتMRS آگار و در دمای گرمخانه‌گذاری 37 درجه سانتی‌گراد، تعیین و نشان دادند که باکتری، پس از 14 تا 16 ساعت، وارد فاز ثابت رشد می‌شود. نتایج بدست آمده در تحقیقات پیشین، با نتایج این تحقیق همخوانی دارد، تفاوت اندکی که مشاهده می‌شود مربوط به شرایط محیطی و متفاوت‌بودن نوع سویه باکتری مورد آزمایش می‌باشد که بر سرعت رشد تاثیرگذار هستند (Kahm, 2010).

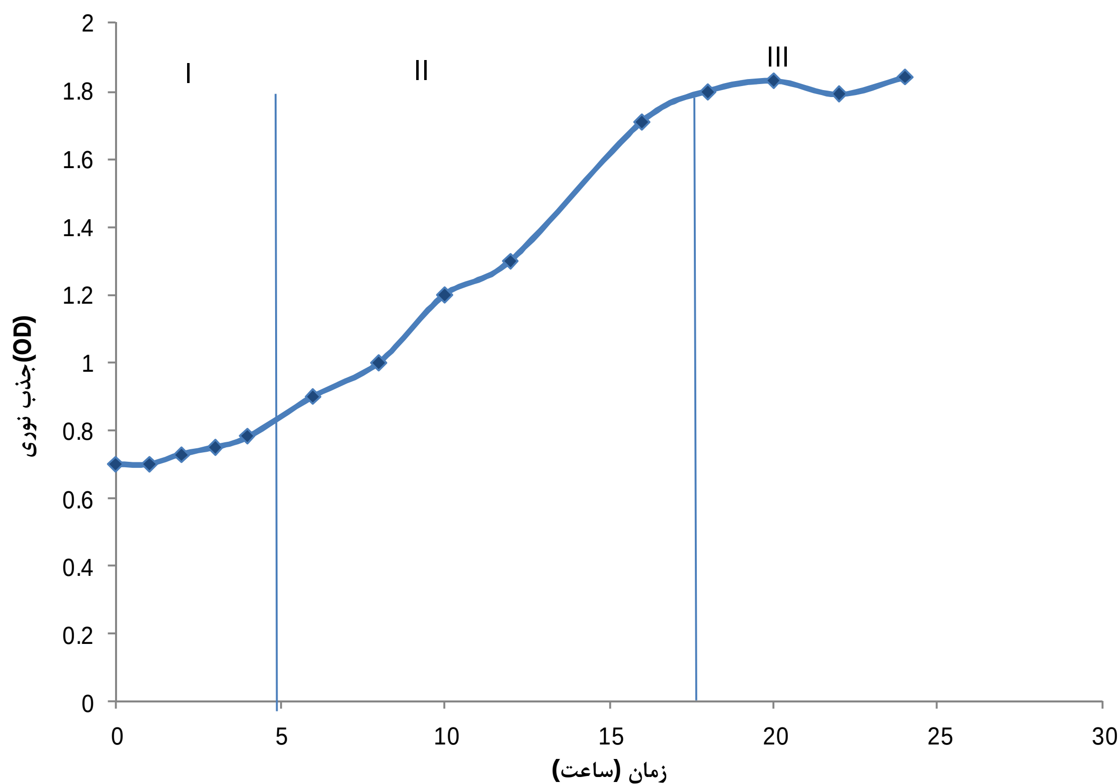
بررسی نسبت‌های مختلف قند و باکتری بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از جذب بر روی پودر MCC

هدف از این بخش از آزمایشات تعیین نسبت بهینه قند (مالتودکسترین و سوربیتول) و باکتری در محلول اولیه (جدول 1) به‌گونه‌ای که بیشترین میزان زنده‌مانی نسبی (٪) پس از جذب بر روی پودر، حاصل شود. همان‌طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از جذب

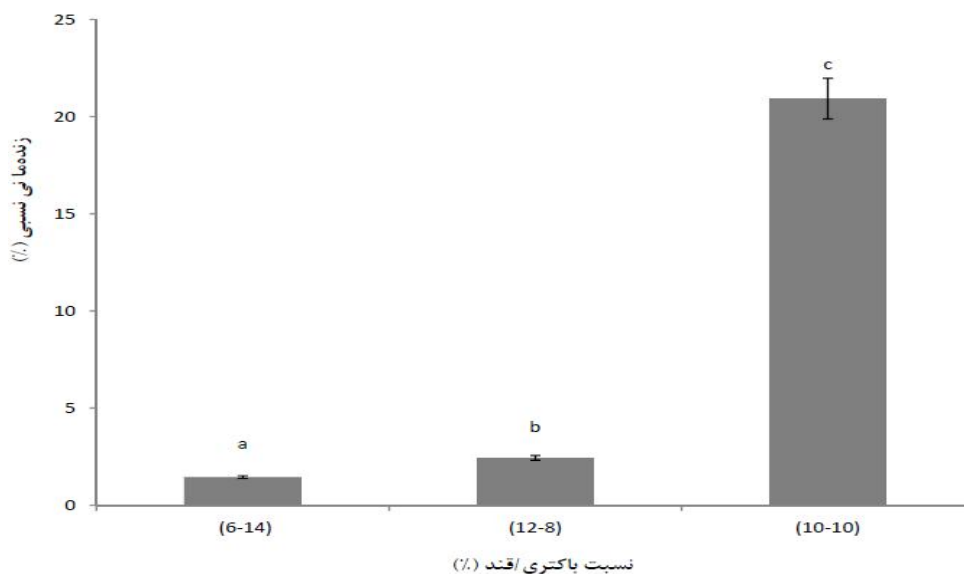
روی MCC در محلول پروبیوتیک اولیـه بـا نسـبت برابـر قنـد و بـاکتری (10^{-10}) به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0/05$) در مقایسه با دو نسبت دیگر افزایش نشان داد. محلول با نسبت بالاتر قند به باکتری (14 –6)، بـه علـت ایجـاد فشار اسمزی بالاتر در محلول پروبیوتیک اولیه، منجر به کـاهش معنـی‌دار ($P \leq 0/05$) در غلظت باکتری‌های زنـده (CFU/ml) پـس از جـذب، در مقایسه با دو نسبت دیگر شد. محلول با نسبت پـایین‌تـر قنـد بـه بـاکتری (8– 12)، در مقایسه به محلول پروبیوتیک با نسبت مساوی قند و بـاکتری کاهش معنی‌داری در غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) پـس از جـذب نشان داد. که این امر بیانگر ایـن اسـت کـه غلظـت 8 درصـد قنـد قـدرت محافظت‌کنندگی مناسبی برای باکتری پروبیوتیک در مرحله جـذب فـراهم نمی‌کند. بیشینه غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) در نسبت برابر قند و باکتری (10-10) بدست آمد و به‌عنـوان غلظـت بهینـه قنـد و بـاکتری در محلول پروبیوتیک اولیه تعیین شد. سمیونو و همکاران (2014)، اثرات نسبت قند (مالتودکسترین وتره هالوز با نسبت برابر) به باکتری (14- 6 و 8- 12) در ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس‌پاراکازئی* با دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور، بر زنده‌مانی نسبی باکتری پس از جـذب بـر روی پـودر MCC در دمای 47 درجه سانتی‌گراد بررسی نمودند. تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0/05$) در میزان زنده‌مانی باکتری در محلول ورودی در نسبت‌های تحـت بررسـی در زمان پوشش‌دهی 40 دقیقه، مشاهده نشد. ولی میزان زنده‌مانی باکتری بعد از 90 دقیقه پوشش‌دهی در نسبت (14- 6)، 25 درصد و در نسبت (8- 12)، 35 درصد بود. نتایج این تحقیق نشان داد که نسبت بالاتر قند به بـاکتری، منجر به کاهش زنده‌مانی می‌شود که با نتایج بدست‌آمـده در ایـن تحقیـق همخوانی داشت. کارلیس و همکاران (2012)، باکتری *بیفیدوباکتریوم‌بیفیدوم* را با شیر پس‌چرخ، اینولین و الیگو فروکتوز با دستگاه خشک‌کن پاششی، در دمای ورودی 2 ±150و خروجی 3± 55 درجه سانتی‌گراد ریزپوشانی نمودند. در نسبت برابر قند به باکتری، کاهش معنی‌داری در میزان زنده‌مانی باکتری طی دوره نگهداری 180 روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد دیده نشد. نتـایج این تحقیق نشان داد کـه نسـبت برابـر قنـد بـه بـاکتری بیشـترین تـاثیر محافظت‌کننـدگی را دارد. کارتیـک (2011)، اثـرات نسـبت‌هـای مختلـف مالتودکسـترین بـه بـاکتری در ریزپوشـانی بـاکتری‌هـای *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسـیلوس‌رامنوسـوس* بـه روش خشـک کردن پاششی بر زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها (٪) را بررسی‌کردند. زنـده‌مـانی نسبی باکتری‌ها در نسبت قند به باکتری (2- 1)، 53/65 درصد، در نسـبت (3- 2)، 70/39 درصد و در نسبت برابر، 84 درصد حاصل شـد. نتـایج ایـن تحقیق نشان‌داد که نسبت (1- 1) قند و باکتری، بالاترین زنده‌مانی نسـبی باکتری‌های تحت بررسی را تامین می‌نمایـد. سـان تریوارانگـا و همکـاران (2007)، اثر افزودن سوربیتول به محلول باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر زنده‌مانی نسبی باکتری پس از خشک‌کردن تحت خلا را با نمونه شـاهد، مقایسه نمودند. زنده‌مانی نسبی باکتری، همراه با 1 درصد سوربیتول نسـبت به نمونه شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد. شل و بیرمن (2014)، اثـرات افـزودن قنـدهای سـوربیتول و مالتودکسـترین در ریزپوشـانی بـاکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* با دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور بر زنده‌مانی نسبی بـاکتری، بررسـی نمودنـد. زنـده‌مـانی نسـبی بـاکتری در هنگـام افـزودن مالتودکسترین 16/66 درصد، سوربیتول 11/98 درصـد و در نمونـه شـاهد، 9/36 درصد بود.

بررسی اثر دماهای تحـت بررسـی هـوای شناورسـازی بـر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از جذب روی پودرMCC

هدف از انجام این بخش از آزمایشات بررسی اثرات دماهای تحت بررسی هوای شناورسازی بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از جذب روی پودر MCC و تعیین دمای بهینه می‌باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود (شکل 4)، غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) پس از جذب روی پودر MCC در محلول پروبیوتیـک اولیـه در دمـای ورودی 37 درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری نسبت به دو دمای دیگـر افـزایش نشان می‌دهد. با توجه بـه نتـایج بـه‌دسـت آمـده، دمـای 37 درجـه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای مناسب برای شناورسازی تعیـین و عوامـل دیگر شامل فشار هوای خروجی پمپ و سرعت جریان محلول ورودی، متناسب با این دما جهت جلوگیری از آگلومره‌شدن پودر انتخاب شـد. دمای 37 درجه سانتی‌گراد، دمای بهینه رشد باکتری *لاکتوباسـیلوس روتری* می‌باشد و در طول زمان پوشش‌دهی، خطـر آسـیب حرارتـی، باکتری را تهدید نمی‌کند. سمیونو و همکاران (2014)، تاثیر دو دمای هوای شناورسازی (47 و 62 درجه سانتی‌گراد) را بر زنده‌مانی نسـبی (%) *لاکتوباسیلوس‌پارکازئی* پـس از جـذب بـر روی پـودر MCC در دستگاه پوشـش‌دهنـده بسـتر شـناور (Niro 1 ،Pharma Systems Starea-، سوییس)، بررسی کردند. با افزایش دما به میزان 15 درجـه سانتی‌گراد از 47 به 62 درجه سانتی‌گـراد، میـزان زنـده‌مـانی نسـبی باکتری 250 برابر کاهش یافت. در این تحقیق نیز میزان زنـده‌مـانی نسبی باکتری از 20/6 درصد در دمای 47 درجه سانتی‌گراد به 1/62 درصد در دمای 62 درجه سانتی‌گـراد، کـاهش یافـت. پیـار و کـوک (2014)، اثـرات دمـای هـوای شناورسـازی در ریزپوشـانی بـاکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* با دستگاه پوشش‌دهنده بسـتر شـناور بـا پاشش فوقانی (Uni,Glatt، آلمان) بر میزان آگلومره‌شدن و زنده‌مانی نسبی، بررسی نمودند. پوشش‌دهی در دمای 50-60 درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش زنده‌مانی بـاکتری گردیـد. پوشـش‌دهـی در دمـای 28-30 درجه سانتی‌گراد منجر بـه آگلـومره‌شـدن ذرات شـد. دمـای 36- 38 درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه پوشش‌دهـی انتخـاب شد که در این دما آگلومره‌شـدن ذرات رخ نـداده و بیشـترین میـزان زنده‌مانی باکتری حاصل شد که با نتایج بدست‌آمده در ایـن تحقیـق همخوانی دارد. استفان (2008)، اثرات دو دمای هوای شناورسازی 37 و 45 درجه سانتی‌گراد بر آگلومره شدن ذرات در ریزپوشانی بـاکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* با استفاده از دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور با اسپری تحتانی دو نازله (AMMAG، استرالیا)، بررسی نمودند. در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، آگلومره شدن ذرات رخ نداد و به‌همین دلیل نیز به‌عنوان دمای بهینه برای شناورسازی انتخاب شد.

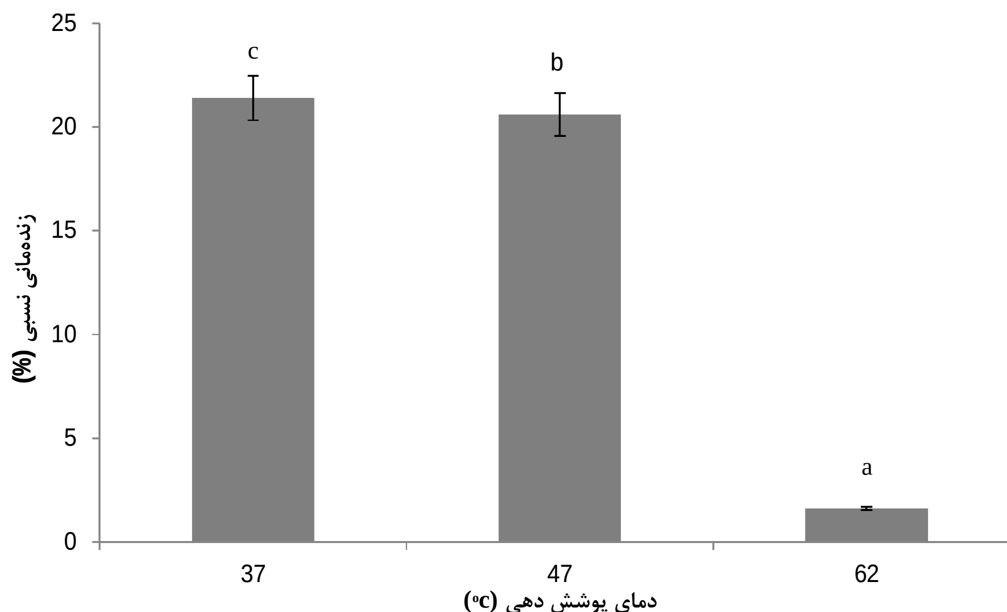


شکل 2- منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس روتری*



شکل 3: تاثیر نسبت‌های تحت بررسی قند و باکتری بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از جذب بر روی پودر MCC

(اعداد بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد).



شکل 4- تاثیر دماهای تحت بررسی هوای شناورسازی بر روی زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از جذب روی پودر MCC

(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند وحروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد)

جدول 1- نسبت‌های مختلف قند و باکتری به‌کاررفته در آزمایش

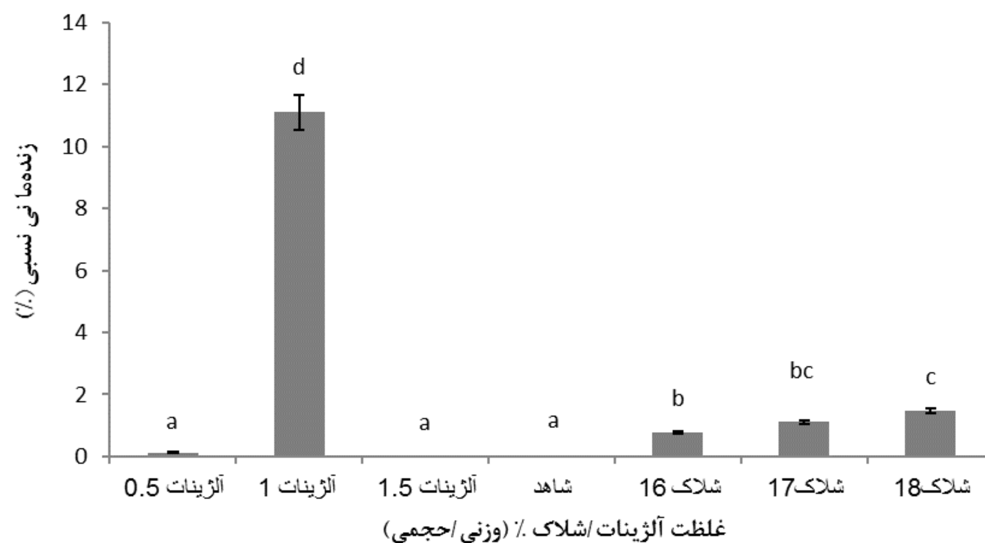
مجموع قندها وزن مجموع قندها در10 میلی‌لیتر محلول پروبیوتیک (g)	پودر باکتری وزن باکتری (g)
8 درصد	12 درصد
(g) 0/8 (0/4g سوربیتول و 0/4g مالتودکسترین با DE=3)	1/2(g)
14 درصد	6 درصد
(g) 4/ (0/7 gسوربیتول و g 0/7مالتودکسترین با DE=3)	0/6 (g)
10 درصد	10 درصد
(g) 1 (0/5 gسوربیتول و g 0/5مالتودکسترین با DE=3)	1 (g)

مقایسه اثر غلظت‌های تحت بررسی آلژینات سدیم و محلول شلاک بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده

در شکل 5، زنده‌مانی نسبی باکتری‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و شلاک پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده مقایسه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)، در پودر پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم با غلظت 1 درصد (وزنی/ حجمی) به‌طور معنی‌داری $(P\leq0/05)$ نسبت به پوشش‌های دیگر افزایش نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری $(P\leq0/05)$ در زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در نمونه‌های پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم 0/5 و 1/5 درصد در مقایسه با نمونه شاهد پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، مشاهده نشد. نمونه شاهد، پودر MCC بدون پوشش می‌باشد که تنها محلول حاوی باکتری و قند (مالتودکسترین و سوربیتول) روی آن جذب شده است. نتایج بررسی نشان داد که زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده با پوشش محلول آلژینات سدیم 0/5 درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته و با افزایش غلظت محلول پوششی تا 1 درصد این افزایش به سطح معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد، رسیده است. ولی با افزایش بیشتر غلظت تا 1/5 درصد، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش معنی‌داری نشان نمی‌دهد. می‌توان نتیجه گرفت، افزایش غلظت در سطح 1/5 درصد باعث شده است که محلول غلیظ در برخورد با جریان هوای خروجی پمپ نتواند به ذرات

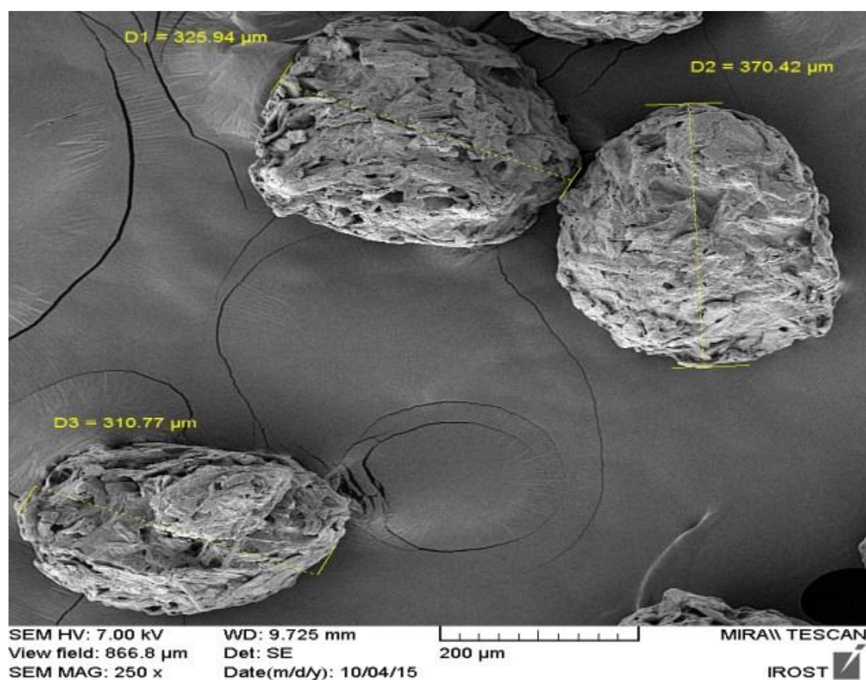
ریز تبدیل شده و اتمایزه محلول به درستی صورت نگیرد. ماندل و همکاران (2006)، باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* را با آلژینات در غلظت‌های 2، 3 و 4 درصد، به روش امولسیون، ریزپوشانی و زنده‌مانی باکتری را پس از طی دوره زمانی (1-3) ساعت در شرایط شبیه‌سازی شده معده بررسی کردند. نتایج بررسی نشان داد که افزایش غلظت آلژینات منجر به افزایش زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی شده می‌گردد. لی و هیو (2000)، باکتری *بیفیدوباکتریوم‌لانگوم* را با آلژینات سدیم در غلظت‌های 2، 3 و 4 درصد با روش امولسیون، ریزپوشانی‌کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت آلژینات سدیم و اندازه قطر میکروکپسول، زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، افزایش می‌یابد. موتوکاماراسامی و همکاران (2006)، پنج نوع مختلف از باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* را به‌صورت جداگانه با آلژینات سدیم به دو روش اکستروژن و امولسیون ریزپوشانی و نشان دادند که میکروکپسول‌های تولید شده به روش اکستروژن محافظت بیشتری از باکتری در برابر شرایط اسیدی معده نسبت به روش امولسیون ایجاد کردند. گراف و همکاران (2007)، مخمر *ساکارومایسس‌بولاردی* را با آلژینات سدیم با غلظت 2 درصد (وزنی/ حجمی) به روش امولسیون ریزپوشانی کردند. میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی 1 ساعت در شرایط اسیدی معده برابر با 13/3 درصد بود. سابیخی و همکاران (2010)، باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را با آلژینات سدیم با غلظت 4 درصد (وزنی/ حجمی) و نشاسته ذرت با غلظت 2 درصد (وزنی/ حجمی) به روش امولسیون ریزپوشانی کردند. میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده در نمونه‌های ریزپوشانی شده 1/71 سیکل لگاریتمی و در نمونه شاهد 4/94 سیکل لگاریتمی، کاهش یافت. سلتانا و همکاران (2000)، باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را با آلژینات سدیم با غلظت 2 درصد (وزنی/ حجمی) و 2 درصد نشاسته ذرت (ترکیب پری‌بیوتیک) به روش امولسیون ریزپوشانی کردند. میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی 3 ساعت در شرایط اسیدی، 5 سیکل لگاریتمی کاهش یافت. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در پودر پوشش‌دهی شده با محلول شلاک با غلظت 18 درصد (حجمی/ وزنی) به‌طور معنی‌داری $(P\leq0/05)$ نسبت به غلظت‌های دیگرتحت بررسی محلول شلاک افزایش نشان می‌دهد. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در نمونه‌های پوشش‌دهی شده با محلول شلاک نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری $(P\leq0/05)$ نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که، زنده‌مانی نسبی (٪) در میکروکپسول پوشش‌دهی شده با شلاک 17 درصد پس از آزمون مقاومت اسیدی با نمونه‌های پوشش‌دهی شده با 16 و 18 درصد محلول شلاک تفاوت معنی‌داری $(P\leq0/05)$ ندارد. با افزایش غلظت محلول شلاک، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، افزایش می‌یابد. افزایش غلظت تا حدی امکان‌پذیر است که بتوان محلول را در دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور، اتمایزه نمود که برای غلظت های بالای 18 درصد محلول شلاک مقدور نبود. شل و بیرمن (2014)، از پوشش شلاک 25 درصد (وزنی/ حجمی) و پروتئین آب‌پنیر شیرین برای ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس‌روتری* با پوشش‌دهنده بستر شناور استفاده کردند، زنده‌مانی نسبی باکتری پس از طی دوره زمانی در محیط شبیه‌سازی شده اسید معده 24/36 ±76/74 درصد که در مقایسه با نمونه شاهد، 10/51 ±17/74 درصد، افزایش معنی‌داری $(P\leq0/05)$ مشاهده شد. شل و بیرمن (2014)، نشان دادند که که با افزایش غلظت محلول شلاک، زنده‌مانی نسبی (٪) باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* پس از دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده افزایش می‌یابد. استامر و همکاران (2010)، باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* را یک‌بار با محلول شلاک و گلیسرول و بار دیگر با محلول شلاک و آلژینات سدیم با نسبت‌های 95 و 5 درصد و با استفاده از دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور، ریزپوشانی و زنده‌مانی نسبی باکتری پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، بررسی‌کردند. زنده‌مانی نسبی باکتری پس از طی دوره زمانی در محیط شبیه‌سازی شده اسید معده، با محلول شلاک- گلیسرول و شلاک- آلژینات سدیم، به‌ترتیب 41 درصد و 0/14 درصد بود. حاماد و همکاران (2012)، مخمر پروبیوتیکی *ساکارومایسس‌سرویزیه* را با خشک‌کن پاششی با استفاده از محلول شلاک ریزپوشانی و واکنش سلول مخمر را در مواجهه با محیط اسیدی با غلظت 1 درصد مولار هیدروکلریک اسید با انجام آزمون رنگ‌سنجی فلورسنت بررسی نمودند. نتایج بررسی نشان داد که پوشش شلاک برای محافظت از باکتری‌های حساس به محیط اسیدی مناسب می‌باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده، بیشترین زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده با پوشش آلژینات سدیم با غلظت 1 درصد مشاهده شد. مقایسه تصویر میکروسکوپ الکترونی کپسول پوشش‌دهی شده با محلول شلاک 18 درصد (شکل 6) با تصویر کپسول پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم 1% (شکل 7) نشان می‌دهد که محلول آلژینات سدیم 1% در مقایسه با محلول شلاک 18% ، پوششی یکدست‌تر، یکنواخت‌تر و با تخلخل کمتر ایجاد کرده است و به‌عنوان پوشش مناسب انتخاب شد.

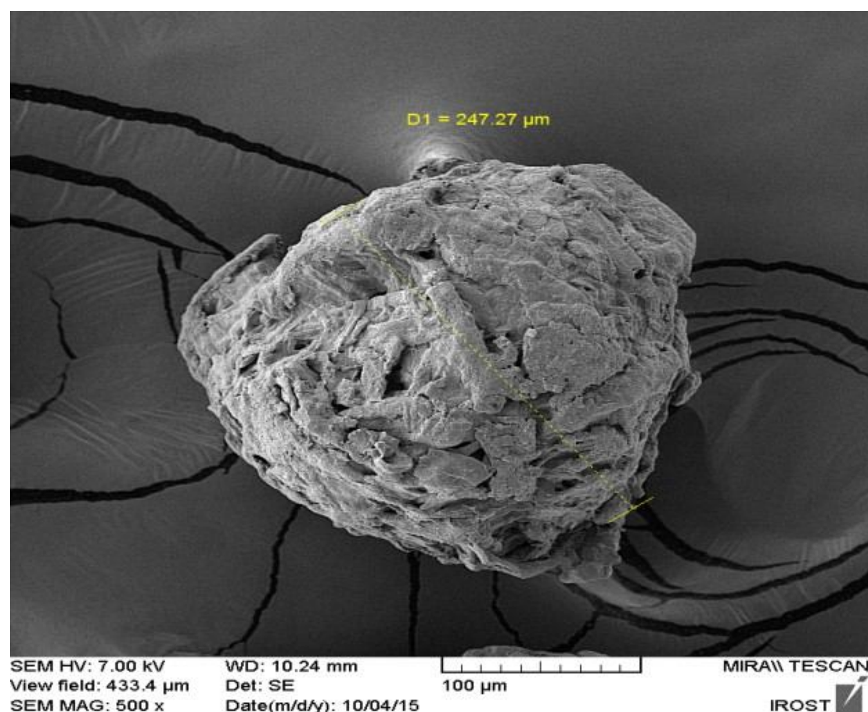


شکل 5- مقایسه تاثیر پوشش‌های آلژینات سدیم و محلول شلاک در غلظت‌های مختلف بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از طی دوره زمانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده

(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد)



شکل 6- باکتری پوشش‌دهی شده با محلول شلاک 18%



شکل 7- باکتری پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم 1%

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که فناوری بستر شناور روشی مناسب برای افزایش زنده‌مانی میکروکپسول‌های پوسته- هسته *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده می‌باشد. تعیین و بکارگیری شرایط بهینه پوشش‌دهی شامل نسبت ترکیبات قندی به غلظت باکتری، دمای جریان هوای شناورسازی و نوع ترکیبات بکاررفته در پوشش‌دهی، می‌تواند منجر به بهبود زنده‌مانی باکتری‌ها قبل و پس از قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی اسیدی معده، شود. ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با فناوری بسترشناور روشی است که می‌تواند با بهبود مقاومت باکتری‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند شرایط اسیدی معده، به گسترش و توسعه فرآورده‌های پروبیوتیک کمک نماید.

منابع

Bian, L., 2008, An in vitro antimicrobial and safety study of Lactobacillus reuteri DPC16 for validation of probiotic concept, Master’s thesis, Massey University, *Auckland*, New Zealand.

Carlise, B., Fritzen-Freire, A., Elane, S., Prudêncio, A., Renata, D., Amboni, A., Stephanie, S.& Pinto, A.,2012, Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45, 306–312.

Graff, S., Hussain, S., Chaumeil, J.C.& Charrueaul, C., 2007, Increased intestinal delivery of viable Saccharomyces boulardii by encapsulation in microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25, 1290-1296.

Hamad, S.A., Stoyanov, S.D.& Paunov, V.N., 2012, Triggered cell release from shellac-cell composite microcapsules, Soft Matter, 5069-5077.

Kahm, M., AhrCampus, R.& Hasenbrink, G., 2010, grofit: Fitting Biological Growth Curves with R. *Journal of Statistical Software*, 33(7), 23-45.

Kartheek, A., 2011, Microencapsulation of probiotics (Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus rhamnosus) in raspberry powder by spray drying: optimization and storage stability studies. Master’s thesis, McGill University, *Québec*, Canada.

Lee, K. Y.& Heo, T., 2000, Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 869–873.

Mandal, S., Puniya, K.& Singh, K., 2006, Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated

Lactobacillus casei NCDC-298. *International Dairy Journal*, 126(2-3), 249-28-4.
Marinescu, D., 2012, Bile Salt Hydrolyzing Lactobacillus reuteri (NCIMB 30242) for the reduction of markers of metabolic disease. Master's thesis, McGill University, Québec, Canada. Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C.& Ross, R.P., 2006, Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106, 1406–1416.
Michael, T., Cook, G., Tzortzis, D.& Charalampopoulos, V.,2010, Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67.
Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P.& Holley, R.A., 2006, Stability of Lactobacillus reuteri in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71, 20-24.
Piar, H.& Kok, k., 2014, Enteric coating of granules containing the probiotic Lactobacillus acidophilus. *Acta Pharmaceutica*, 64, 247–256.
Reid, G., 2015, The growth potential for dairy probiotics. International Dairy Journal, 49: 16–22. Stephen, R.L., Werner Jim, R., Anthony, H.J., Richard, H., Archer, D.& Pearce, L., 2007, Air-suspension particle coating in the food industry: Part I — *state of the art*. *Powder Technology*, 171, 25–33.
Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. K.& Kapila, S., 2010, Resistance of Microencapsulated Lactobacillus acidophil LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. *Food Bioprocess Technology*, 3, 586–593.
Santivarangkna, C., Kulozik, U.& Foerst, P., 2007, Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnology*, 23, 302-315.
Sanjay, K., Jain, A., Yashwant, G.& Manisha, A., 2007, Design and Development of Hydrogel Beads for Targeted Drug Delivery to the Colon. *AAPS PharmSciTech*, 8 (3), 56.
Schell, D.& Beermann, C., 2014, Fluidized bed microencapsulation of Lactobacillus reuteri with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. *Food Research International*, 62, 308.
Semyonov, D., Ramon, O., Kovacs, A., Friedlander, L.& Shimoni, E., 2014, Air-Suspension Fluidized-Bed Microencapsulation of Probiotics. *Drying Technology*: *An International Journal*, 30(16), 1918-1930.
Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N.& Shimoni, E., 2010, Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. *Food Research International*, 43(1), 193–20.
Sinha, A., Dudani, T.&Ranganathan, B.,2001, National dairy Research protective effect of fortified skim milk as suspending medium for freeze drying of different Lactic acid bacteria. *Journal of food science*, 39.
Stephan, A., 2008, Innovative product formulations applying the fluidised bed technology. Doctoral thesis, book edited by Everlon Cid Rigobelo, *ISBN* 978-953-51-0776-7
Stummer, S., Salar-Behzadi, S., Unger, F., M, Oelzant., Penning, M.& Viernstein, H.,2010, Application of shellac for the development of probiotic formulations. *Food Research International*, 43, 1312–1320.
Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P.& Kailasapathy, K., 2000, Encapsulatio of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55.
Wagner, R., Shemedia, J.& Johnson, L., 2012, Protection of Vaginal Epithelial Cells with Probiotic Lactobacilli and the Effect of Estrogen against Infection by Candida albicans Microbiology Division, National Center for Toxicological Research, Jefferson, USA. *Open Journal of Medical Microbiology*, 2, 54-64
Wolfgang, K., Andreas, R.& Klaus, D., 2000, In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health and Disease*,12, 27–34.
Wurster, E., 1959, Air-Suspension Technique of Coating Drug Particles. *Journal of the American Pharmaceuticasaslociation*, XLVIII, 8.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 844-857





نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 857-844

Developing probiotic bread using *Lactobacillus reuteri* part 1: Evaluation of fluidized bed microencapsulation on viability of *Lactobacillus reuteri* in simulated gastrointestinal conditions

L. Zaghari[1], A. R. Bassiri[2*], S. Rahimi[2], A. Zonusi[2]

Received: 2016.06.18
Accepted: 2016.12.18

Intoduction: Probiotics are defined as essential live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. The range of beneficial properties reaches from lowering cholesterol to preventing cancer. The most important probiotic microorganisms belong to the group of lactic acid bacteria. *Lactobacillus reuteri* which naturally occurs in the human intestine possess probiotic properties with good colonization potential. The development of probiotic foods presents many challenges, particularly with respect to the stability of the bioactive compounds during processing, storage and passage through acidic gastric environment. Therefore, it is a great challenge to bring the probiotics into a stable form, which guarantees, that the microorganisms reach their target location, the human intestine, in an adequate amount. Microencapsulation helps improve survival probiotic bacteria from environmental stresses. In most studies, probiotic bacteria are entrapped in a gel matrix of natural biological materials such as alginate, or gellan. The core and wall solutions are turned into drops of the desired size by employing an emulsion method. The main problem in the probiotic entrapment approach is that gel bead entrapment technologies generally stabilize the bacteria in liquid products and are difficult to scale up. In order to extend the shelf life of encapsulated probiotics, a glassy state form of the embedding matrix is required. This can be achieved by employing such as air-suspension fluidized-bed coating. In the present research, an air-suspension fluidized-bed technique for generation of core and shell microcapsules containing probiotic *Lactobacillus reuteri* cells and the efficacy of shellac and sodium alginate at different concentrations on viability of capsules in simulated gastrointestinal conditions was evaluated.

Materials and methods: Pure freeze-dried *Lactobacillus reuteri* PT-1655 were obtained from Persian Type Culture Collection (Tehran, Iran) and were activated by inoculation in the MRS broth at 37°C for 36-48 h. The air-suspension process was performed in a Wurster coater system with a bottomspraying atomizer. The growth curve of lactobacillus reuteri were determined by measuring the optical density (turbidity) at 600 nm to estimate the time when the growth curve enters a stationary phase in which bacteria develop a general stress resistance and are thus more resistant to various types of stresses. In various pretests the fluidization pressure, the atomization pressure and the spraying rate of the microencapsulation process were varied to examine their influence on process conditions, especially on the particle development. Several different solutions of *Lactobacillus reuteri* were prepared and evaluated for percentage survival during the coating. The solution containing *Lactobacillus reuteri* (6–12 g/100 g solution), maltodextrin (4–7 g/100 g solution) and sorbitol (4–7 g/100 g solution) concentrations was spray-coated at three inlet temperatures: 37, 47 and 62°C onto and absorbed by the inert carrier microcrystalline cellulose to produce nonagglomerating dry coated. For the coating processes an aqueous shellac solution at 3 concentrations (16, 17 and 18% (w/v)), containing plasticizers in the ratios of 95 + 5 and an aqueous sodium alginate solution at 3 concentrations (0.5, 1 and 1.5% (w/v)), were used. Simulated gastric juice was prepared fresh daily containing 3.2 mg of pepsin, 1 ml of NaCl solution (0.5%) and acidified with HCl (1.2 M) to pH 1.5 ± 0.5. Tolerance to gastric juice was examined by placing freshly prepared cells in a tube containing sterile simulated gastric juice for 1 h and incubated at 37°C for 2 h. To characterize the morphology of the MCC particles coated with the different matrix formulations, SEM images were taken. Experimental data have been represented as the mean with standard deviation (SD) of different independent determinations. The significance of differences was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

---

1. Former M.Sc. Student of Food Science and Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Food Technology and processing Faculty, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Biosystems Engineering Faculty, Department of Agricultural research, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: bassiri@irost.ir)

Results and discussion: The obtained growth curve showed that over the first 4 hours after inoculation bacteria are in lag phase, the colony entering the log phase of growth after 5–16 hours and from 16 to 18 hours after inoculation, bacteria come into the stationary phase and the biomass was ready to removal from growth media. Inlet air temperature, was shown to play an important role in the survival of bacteria; a 15°C increase in inlet air temperature led to a 12.7-fold decrease in survival percentage. The investigation of effect of inlet air temperature and ratio of bacteria to sugars in formulation on cell viability shows that at temperature of 37°C and ratio of 10: 10 the cell viability was significantly higher. There was a nonsignificant decrease in relative survival of bacteria absorbed into the matrix before and after coating with shellac at 3 concentrations (16, 17 and 18% w/v) and sodium alginate at 3 concentrations (0.5, 1 and 1.5% w/v). The relative survival (%) of bacteria coated with sodium alginate at concentration of 1% (w/v) was significantly higher compared to other solutions under simulated gastro-intestinal conditions (pH 2.0, for 1h).

Keywords: *Lactobacillus reuteri*, microencapsulation, fluidized bed coater, simulated gastrointestinal conditions